

Cambios en el fenotipo floral de especies neotropicales de *Salvia* asociados a transiciones en el síndrome de polinización: Integración de patrones filogenéticos, microevolutivos y herramientas de morfometría geométrica.

Antecedentes:

La morfología floral ha sido considerada como un rasgo determinante en el aislamiento reproductivo entre las especies debido su influencia en el comportamiento de los polinizadores (Grant, V. 1994). Su importancia radica en que, por un lado, influye en la atracción del polinizador y por otra parte determina, mediante un ajuste morfológico, en qué región del cuerpo del polinizador se va a depositar el polen y la eficiencia en el transporte del mismo (Kaczorowski *et al.* 2012).

En muchos grupos de angiospermas la selección debida a diferentes polinizadores puede derivar en un aislamiento reproductivo que conduzca al origen de nuevas especies, mediante un mecanismo de radiación adaptativa (ver, entre otros DeWitt Smith, S. 2010; Fulton M. y Hodges S. A., 1999; Goldblatt P. *et al.* 2000; Linder, H.P., 2003; Shemske, D. W., Bradshaw H. D. Jr, 1999; Whittall, J. B. y Hodges, S. A., 2007) el cual se caracteriza por la rápida diversificación de los miembros de un linaje en una variedad de formas que difieren en su sistema de polinización (Schluter, D. 2000).

La evolución de los fenotipos florales no puede ser comprendida a través del estudio de rasgos independientes, ya que los rasgos que forman la flor se encuentran integrados a nivel genético, de desarrollo y funcional (Klingenberg, C. P., 2010; Pigliucci, M. 2003). Esta falta de independencia ha conducido a dificultades a la hora de caracterizar las unidades del cambio evolutivo (Fulton, M. y Hodges, S. A., 1999), ya que, si bien la selección natural puede alterar las asociaciones entre rasgos, los patrones preexistentes de correlaciones genéticas pueden limitar la acción de la selección. La comparación de patrones de asociación entre rasgos en especies relacionadas puede ayudar a entender si ésta asociación sesga la dirección y velocidad del cambio evolutivo, limitando o facilitando la evolución a lo largo de ciertas direcciones en el morfoespacio (Porto, A. *et al.*, 2009; Coner, J. K. 2002; Ashman and Majetic 2006; Kaczorowski *et al.* 2008).

El análisis de las correlaciones entre las variables que forman el fenotipo floral y el componente genético de dicho fenotipo podrían aportar información valiosa para predecir la respuesta de fenotipos florales complejos e integrados a la selección fenotípica mediada por polinizadores (Gomez *et al.*, 2009). Los estudios que han indagado sobre la heredabilidad de la forma floral definieron la forma a través de algunas variables lineales relacionadas al tamaño como longitud del tubo floral, ancho del tubo, número de flores, etc. Sin embargo, la forma floral es un complejo multidimensional de caracteres y, por lo tanto, necesita un enfoque multivariado para explorar la heredabilidad de la forma floral (Gómez *et al.* 2009).

Grupos de angiospermas con sistemas de polinización altamente diversificados ofrecen la oportunidad de realizar éstas comparaciones, ya que los distintos grupos de polinizadores ejercen presiones de selección contrastantes, imponiendo modificaciones al plan básico de desarrollo y asociación entre rasgos. Sin embargo, las especies de un mismo clado no pueden considerarse como datos independientes debido a que comparten una historia evolutiva común (Grafen, A. 1989 y Martins, E. P. y Hansen, T. F., 1997), por lo cual es necesario tener en cuenta esta historia al momento de realizar comparaciones.

El subgénero *Calosphace* involucra las especies neotropicales de *Salvia* y constituye un clado monofilético (Walker, J. B. *et al.* 2004; Jenks, A. A., *et al.* en prensa), a diferencia de las especies de *Salvia* del Viejo Mundo. Una filogenia integral del clado se encuentra en prensa (Jenks, A. A., *et al.* en prensa). Se caracteriza por el mecanismo de polinización más complejo dentro de la familia Lamiaceae ya que sus anteras se modifican en un sistema de palanca (Classen-Bockhoff, R. *et al.* 2004). Además, este grupo presenta dos síndromes de polinización contrastantes,

presentando especies polinizadas por himenópteros y por colibríes. Al respecto se especula que la ornitofilia ha evolucionado repetidas veces a partir de la melitofilia en este clado (Wester P, Classen-Bockhoff R. 2011). En el género *Salvia* habrían ocurrido modificaciones en la arquitectura de las flores asociadas a transiciones en el síndrome de polinización. Mientras las especies melitófilas se caracterizan por presentar flores bilabiadas o personadas, las especies ornitófilas presentan flores tubulares, bilabiadas y en algunos casos con estambres o labios superiores más largos, que aumentan la longitud operativa de la flor.. En el género *Salvia* el síndrome de polinización por colibríes habría surgido independientemente en diferentes oportunidades pero el patrón de asociación entre las variables morfológicas que intervinieron en dichos cambios serían diferentes. Así, cada transición en el síndrome floral, acarrearía diferentes modificaciones en el plan básico de asociación entre los rasgos fenotípicos que definen la morfología floral, dando origen a la diversidad de flores ornitófilas actual.

Hipótesis

En especies del mismo clado con síndromes florales distintos, existirán diferencias en la morfología floral producto de las presiones selectivas de los diferentes polinizadores. Sin embargo, las restricciones genéticas asociadas al plan básico de asociación entre rasgos pueden determinar la dirección en que ocurren los cambios en la morfología floral.

Objetivos generales

Nos proponemos comparar los patrones de integración morfológica en *Salvia* (subgénero *Calosphace*) y analizar sus consecuencias evolutivas utilizando una combinación de técnicas de morfometría geométrica y herramientas filogenéticas. Examinaremos, además, las bases genéticas de los cambios en la morfología floral de dos especies hermanas con síndromes de polinización distintos (*S. pallida* y *S. guaranítica*).

Objetivos específicos:

- Caracterizar la morfología floral de las diferentes especies utilizando morfometría geométrica.
- Determinar el elenco de polinizadores de las distintas especies.
- Comparar la morfología floral utilizando métodos filogenéticos comparativos para determinar si existe una asociación entre el síndrome de polinización y la morfología floral..
- Examinar si existe una convergencia en la morfología de las especies ornitófilas o no, y en el último caso, si las diferentes morfologías florales se asocian a transiciones independientes entre síndromes.
- Determinar el componente genético de la morfología floral en especies hermanas con síndromes de polinización diferentes.
- Proponer cuáles habrían sido los cambios producidos por la selección natural en la transición de síndromes entre las dos especies.

Materiales y métodos

Sistema de estudio:

Salvia (subgénero *Calosphace*) es un subgénero neotropical, constituye un grupo monofilético (Walker, J. B., *et al.* (2004; Jenks, A. A., *et al.* en prensa) e involucra más de 500 especies. Presenta flores tubulares o bilabiadas y distintos síndromes de polinización, siendo la mayoría de las especies polinizadas por himenópteros y alrededor de dos quintos por colibríes (Wester, P. y Classen-Bockhoff, R. 2011). En el presente estudio, se muestrearán especies sudamericanas y mexicanas.

Elenco de polinizadores:

Se realizarán observaciones de los visitantes florales en cada una de las poblaciones estudiadas. Se obtendrán valores de frecuencias de visitas y se registrará el comportamiento de los visitantes en las flores. Para determinar la frecuencia se focalizarán parches con números conocidos de flores en los que se registrarán las visitas durante lapsos de 30 min. Se realizarán 6 réplicas, preferentemente en diferentes horas del día para determinar la identidad de los principales polinizadores. En caso de no poder realizar las observaciones a campo, se utilizarán datos bibliográficos del elenco de polinizadores en las especies muestreadas.

Análisis filogenéticos:

De Las 500 especies, 175 ya cuentan con datos moleculares depositados en genBank y se encuentran incluidas en una filogenia del subgénero (Jenks, A. A., *et al.* en prensa). En caso de muestrear especies no incluidas en Jenks, A. A., *et al.* en prensa, se seguirá el mismo protocolo con el fin de incorporarlas a una filogenia integral del subgénero. Para esto se utilizarán caracteres moleculares provenientes del ADN nuclear (ITS) y del ADN cloroplástico (psbA-trnH y trnL-trnF). Se tomarán como grupos externos especies del subgénero *Audibertia* y *Dorystaechas hastata* (Walker, J. B., *et al.* 2004; Jenks, A. A., *et al.*, 2011; Jenks, A. A., *et al.* en prensa). Se extraerá y amplificará el ADN en 3 individuos de cada población o especie siguiendo el protocolo propuesto por Levin y Miller (2005). Las secuencias serán ensambladas y luego alineadas utilizando el programa Bioedit y las delecciones serán codificadas según lo sugerido por Simmons y Ochoterena (Simmons, M. y Ochoterena, H., 2000). Se realizarán análisis de parsimonia de los datos utilizando el programa TNT (Tree analysis using New Technology) version 1.1 (Goloboff P, Farris S., Nixon K. 2000) y de inferencia bayesiana con el programa Beast versión 1.7 (Drummond, A. y Rambaut, A., 2007) .

Morfometría geométrica:

Se utilizará esta técnica para comparar la morfología floral de especies con diferentes polinizadores. Se tomarán fotografías digitales de las flores en vista de perfil. Se recuperarán las coordenadas de los landmarks (fig. 1) y se calculará la forma promedio de cada una de las especies utilizando una superposición generalizada de Procrusto (Rohlf, F. J. y Slice, D., 1990; Zelditch, M. L., *et al.* 2004). Para cada espécimen se calculará el tamaño del centroide. A partir de las deformaciones parciales se obtendrá, mediante un análisis de componentes principales, las deformaciones relativas (RW, *relative warps*)

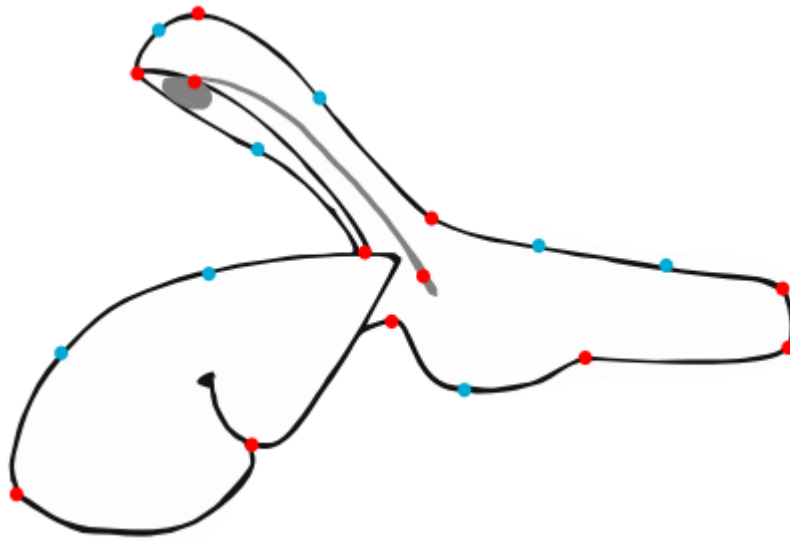


Fig. 1: Esquema general de la corola y los estambres (palanca) de una flor del género *Salvia* que muestra los sitios donde se situarán los landmarks de tipo I (círculos rojos) y semilandmarks (círculos celestes).

Métodos filogenéticos comparativos:

La señal filogenética en la forma será estudiada mediante el mapeo de la morfología en la filogenia utilizando el programa MorphoJ (Klingenberg, C. P., 2009) para inferir los estados ancestrales de los RW (Klingenberg, C. P. *et al.* 2012). Además, se realizará un test de permutaciones para establecer si los datos morfo-geométricos contienen señal filogenética (Klingenberg, C. P. y Gidaszewski, N. A. 2010).

Los valores de RW de grupos de especies con distintos polinizadores serán comparados mediante análisis multivariado de la varianza (MANOVA). La información filogenética será incorporada a las comparaciones utilizando mínimos cuadrados generalizados filogenéticos (PGLS) para estimar diferencias entre síndromes de polinización (Rosas-Guerrero V, *et al.* 2011).

Para detectar posibles convergencias de la forma entre especies de diferentes ramas se construirá un filomorfoespacio. Para ello se mapeará la filogenia en el subespacio de forma compuesto por los principales ejes de variación entre especies (Componentes principales). La posición de los nodos será estimada por reconstrucción de caracteres ancestrales (Monteiro L. R. 2013).

Determinación de los patrones de asociación entre caracteres:

Se realizará un análisis de modularidad sobre las coordenadas de landmarks y semilandmarks. Para esto, se utilizará el método de minimización del coeficiente multi-set R_v de Escouffier de asociación entre matrices para encontrar la partición ideal que maximiza las correlaciones intra-modulares y minimiza las correlaciones inter-modulares (Klingenberg, C. P., 2009). Estos cálculos se realizarán utilizando la rutina del programa MorphoJ (Klingenberg, C. P., 2009). Se propondrán arquitecturas modulares hipotéticas determinándose si el valor de R_v predicho por ellas es significativamente más bajo que el encontrado en las particiones al azar. Las hipótesis a probar serán: i) Todas las especies del grupo comparten la misma estructura modular, ii) las estructuras modulares difieren entre grupos de especies con distintos polinizadores.

Determinación del componente genético de la morfología floral

Se seleccionarán 50 individuos de las especies focales (tentativamente *S. guaranitica* y *S. pallida*), de los cuales será extraída una estaca para establecer las poblaciones que se cultivarán en los invernáculos del IMBIV. Estas plantas madres serán propagadas vegetativamente para establecer familias clonales de 6 a 10 individuos. En cada uno de los individuos resultantes se caracterizará la morfología floral mediante morfometría geométrica como se explica más arriba. Se estimarán los parámetros de genética cuantitativa utilizando máxima verosimilitud restringida, para lo cual los datos de la forma se introducirán como componentes principales incluyendo el tamaño del centroide como covariable y la familia clonal como efecto aleatorio, siguiendo la metodología Klingenberg *et al.* (Klingenberg, *et al.* 2010). Se estimará la heredabilidad de la forma floral como la proporción de las varianzas totales de las matrices **G** (genética) y **P** (fenotípica) obtenidas de los *Relative Warps* (Monteiro L. R. *et al.* 2002). Se obtendrán las matrices **G** de varianza-covarianza genética y sobre ellas se realizarán análisis de modularidad siguiendo la metodología descripta arriba.

Bibliografía

- Ashman T-L, Majetic CJ. 2006. Genetic constraints on floral evolution: a review and evaluation of patterns. *Heredity* 96: 343–352.
- Classen-Bockhoff R, Crone M, Baikovay E. (2004). The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): a key innovation for adaptive radiation? *Int. J. Pl. Sci.* 165, 475-498.
- Conner J. K. 2002. Genetic mechanisms of floral trait correlations in a natural population. *Nature* 420: 407 –410.
- DeWitt Smith S (2010). Using phylogenetics to detect pollinator-mediated floral evolution. *New Phytol.* 188, 354-363.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Fulton M, Hodges SA (1999). Floral isolation between *Aquilegia formosa* and *Aquilegia pubescens*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 266, 2247-2252.
- Goloboff P, Farris S., Nixon K. 2000. TNT. Published by the authors, Tucumán, Argentina.
- Gómez, J. M., Abdelaziz, M., Muñoz-Pajares y Perfectti, F. (2009) Heritability and genetic correlation of corolla shape and size in *erisimum mediohispanicum*. *Evolution* 63, 1820-1831.
- Grant,V. 1994. Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol 91, 3-10.
- Jenks, A A., Walker, J.B., Kim, S. C. Phylogeny of New World *Salvia* subgenus *Calosphaea* (Lamiaceae) based on cpDNA (psbA-trnH) and nrDNA (ITS) sequence data. En prensa. *J. Plant Res.*
- Kaczorowski RL, Juenger TE, Holtsford TP. 2008. Heritability and correlation structure of nectar and floral morphology traits in *Nicotiana glauca*. *Evolution* 62: 1738–1750.
- Kaczorowski, R., Seliger, A., Gaskett, A., Wigsten, S. y Raguso, R. 2012. Corolla shape vs. size in flower choice by an nocturnal hawkmoth pollinator. *British Ecological Society, Functional Ecology* 26, 577-587.
- Klingenberg CP, Duttke S, Whelan S, Kim M. (2012). Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: a multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. *J. Evol. Biol.* 25, 115–129.
- Klingenberg CP (2009). Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: tools for evaluating a priori hypotheses. *Evol. Dev.* 11, 405-421.
- Klingenberg CP (2010). Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nat. Rev. Genet.* 11, 623-635.

- Klingenberg CP, Gidaszewski NA. (2010). Testing and Quantifying Phylogenetic Signals and Homoplasy in Morphometric Data. *Syst. Biol.* 59, 254-261.
- Klingenberg CP, Debat, V. y Roff, D. A. (2010). Quantitative genetic of shape in cricket wings: developmental integration in a functional structure. *Evolution* 64: 2935-2951.
- Levin RA, Miller JS. (2005). Relationships within tribe lycieae (solanaceae): paraphyly of *Lycium* and multiple origins of gender dimorphism *Am. J. Bot.* 92, 2044-2053.
- Linder HP (2003). The radiation of the Cape flora, southern Africa *Biol. Rev.* 78, 597-638.
- Martins EP, Hansen TF (1997). Phylogenies and the comparative method: a general approach to incorporating phylogenetic information into the analysis of interspecific data. *Am. Nat.* 149, 646-667.
- Monteiro L. R., Diniz-Filho J. A. F., Dos Reis S. F., Araujo E. D. 2002. Geometric estimates of heritability in biological shape. *Evolution* 56: 563–572.
- Monteiro, L. R. (2013) Morphometrics and the comparative method: studying the evolution of biological shape. *Hystrix, It. J. Mamm.* 24, 1-8.
- Pigliucci M (2003). Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecol Letters.* 6, 265-272.
- Porto A, et al. (2009). The Evolution of Modularity in the Mammalian Skull I: Morphological Integration Patterns and Magnitudes. *Evol Biol.* 36, 118-135.
- Rohlf FJ, Slice D (1990). Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks. *Syst. Zool.* 39, 40-59.
- Rosas-Guerrero V, et al. (2011). Influence of pollination specialization and breeding system on floral integration and phenotypic variation in *Ipomoea*. *Evolution* 65, 350-364.
- Schluter D (2000). The ecology of adaptive radiation. Oxford University Press, UK.
- Shemske DW, Bradshaw HDJr (1999). Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11910-11915.
- Simmons M, Ochoterena H. (2000). Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Syst. Biol.* 49, 369-381.
- Walker JB, et al. (2004). *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe *Mentheae*. *Am. J. Bot.* 91, 1115-1125.
- Wester P, Classen-Bockhoff R. (2011). Pollination Syndromes of New World *Salvia* Species with Special Reference to Bird Pollination. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 98, 101-155.
- Whitall JB, Hodges SA (2007). Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature* 447, 706-710.
- Zelditch ML, et al. (2004). Geometric morphometrics for biologists, a primer. Elsevier, USA.